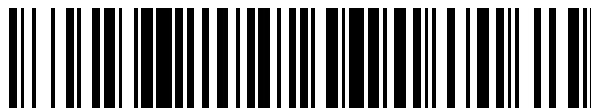


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 626 491**

21 Número de solicitud: 201531761

51 Int. Cl.:

**C12N 15/00**

(2006.01)

12

## SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**03.12.2015**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**25.07.2017**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2016/070852**

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC) (50.0%)**

**C/ Serrano, nº 117**

**28006 Madrid ES y**

**UNIVERSIDAD DE CANTABRIA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MERINO PÉREZ, Jesús y**

**MERINO PÉREZ, Ramón**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

54 Título: **ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A BAMBI Y USO PARA TRATAMIENTO DE  
ENFERMEDADES INFLAMATORIAS**

57 Resumen:

Anticuerpos monoclonales frente a BAMBI y uso para  
tratamiento de enfermedades inflamatorias.

La presente invención se refiere a anticuerpos  
monoclonales específicos frente a un péptido de la  
proteína BAMBI, así como a sus usos y métodos que  
los comprenden. Preferiblemente los anticuerpos se  
utilizan para el tratamiento de enfermedades  
autoinmunes.

ES 2 626 491 A1

**Anticuerpos monoclonales frente a BAMBI y uso para tratamiento de  
enfermedades inflamatorias**

**DESCRIPCIÓN**

5

La presente invención se refiere a anticuerpos frente a la proteína BAMBI (*BMP and Activin Membrane Bound Inhibitory*) y a su uso para el tratamiento y prevención de enfermedades inflamatorias. Por lo tanto, la presente invención se puede encuadrar en el ámbito de la Medicina.

10

**ESTADO DE LA TÉCNICA**

15

Bajo la denominación de enfermedad “autoinmune o inflamatoria crónica” se engloban actualmente más de 100 entidades nosológicas que globalmente afectan a un 10% de la población mundial (Shoenfeld Y *et al.* 2008 J Autoimmun 31:325). Las enfermedades autoinmunes son el resultado de la acción de múltiples agentes ambientales sobre un fondo genético y/o epigenético particular. La acumulación en un mismo individuo de todos estos factores altera la regulación de la respuesta inmune, provocando respuestas aberrantes frente a agentes externos o la reacción del sistema frente a lo propio. La consecuencia es el desarrollo de enfermedades autoinflamatorias y/o autoinmunes.

20

25

Entre las enfermedades autoinmunes se engloban tanto la artritis reumatoide (AR), la psoriasis, la enfermedad inflamatoria intestinal, la espondiloartritis o el lupus eritematoso sistémico, comparten una serie de mecanismos etiopatogénicos y también comparten su respuesta a tratamientos inmunomoduladores o inmunosupresores similares o iguales. La AR es la enfermedad reumática autoinmune más común.

30

En las enfermedades de base autoinmune están especialmente implicados los linfocitos T CD4+, denominación que engloba múltiples subpoblaciones efectoras (linfocitos TH1, TH2, TH17, TFH) o reguladoras (Treg, Tr1), definidas básicamente por el patrón de citocinas que secretan (Zhu J *et al.* 2010 Annu Rev Immunol 28:445; Zygmunt B *et al.* 2011 Adv Immunol 109:159). Alteraciones en el control de los mecanismos que regulan la diferenciación y activación de las diferentes subpoblaciones funcionales de linfocitos T CD4+ se han implicado en el desarrollo de

35

patologías de base inmunitaria. En este sentido, algunas enfermedades autoinmunes severas se han asociado al incremento incontrolado en la diferenciación y/o funcionalidad de los linfocitos TH17 (Röhn TA *et al.* 2006 Eur J Immunol 36:2857; Kebir H *et al.* 2007 Nat Med 13:1173; esclerosis múltiple o artritis reumatoide entre otras) o TFH (Tangye SG *et al.* 2013 Nat Rev Immunol 13:412; lupus eritematoso sistémico). Por el contrario, la disminución en el número y/o actividad supresora de las células Tregs es crítica en el síndrome IPEX, observado en pacientes con mutaciones en el gen *foxp3* (Bennett CL *et al.* 2001 Nat Genet 27:20) o en ratones “scurfy” deficientes en este gen (Khattari R *et al.* 2003 Nat. Immunol 4:337).

10

Para el tratamiento de las enfermedades autoinmunes se han utilizado fármacos inmunosupresores poco específicos y que por lo tanto presentan múltiples efectos adversos. Más recientemente se han comenzado a utilizar anticuerpos monoclonales específicos de citocinas o receptores solubles de dichos factores (denominados globalmente como fármacos biológicos). Estos compuestos presentan como ventaja su gran especificidad y los resultados obtenidos con ellos han sido muy positivos. Sin embargo, la utilización de los fármacos biológicos no está exenta de efectos secundarios graves y además es frecuente la aparición de resistencias a los mismos, que obligan a la suspensión de los tratamientos. Por todo ello, es fundamental el desarrollo de terapias altamente específicas utilizando anticuerpos monoclonales contra nuevas dianas biológicas.

20

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En la presente invención se demuestra el uso de anticuerpos monoclonales frente a BAMBI para el tratamiento y prevención de enfermedades autoinmunes, ejemplificadas éstas con modelos reconocidos de artritis, psoriasis y colitis.

25

En un primer aspecto la presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente una secuencia de aminoácidos que comprende un péptido con al menos un 80% de identidad con SEQ ID NO: 1, preferiblemente un 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100%, donde el tamaño de dicha secuencia de aminoácidos es de entre 15 y 30 aminoácidos (15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos), preferiblemente de 25 aminoácidos.

30

35

El término “anticuerpo”, tal como aquí se utiliza en la presente invención, se refiere a moléculas de inmunoglobulinas y porciones (o fragmentos) inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas. Es decir, moléculas que se unen específicamente (inmunorreaccionan) con un antígeno, tal como, por ejemplo, un péptido o una proteína (un inmunógeno o epítipo). El término “anticuerpo” comprende anticuerpos monoclonales y anticuerpos policlonales, en la presente invención el anticuerpo es monoclonal, y se refiere a un anticuerpo intacto o a fragmentos inmunológicamente activos de él, e incluye anticuerpos humanos, humanizados y de origen no humano, recombinantes, quiméricos y sintéticos. En el contexto de esta invención el término anticuerpo se refiere a la inmunoglobulina que el animal o una célula híbrida ha sintetizado de forma específica frente a la secuencia descrita en el primer aspecto de la presente invención.

Ejemplos de porciones o fragmentos de inmunoglobulinas inmunológicamente activas incluyen fragmentos F(ab) y F(ab')<sub>2</sub>, los cuales pueden ser generados tratando el anticuerpo con una enzima, por ejemplo pepsina.

Los “anticuerpos monoclonales” son poblaciones homogéneas de anticuerpos idénticos, producidos por un hibridoma, es decir, una célula híbrida producto de la fusión de un clon de linfocitos B descendiente de una sola y única célula madre y una célula plasmática tumoral, que están dirigidos contra un único sitio o determinante antigénico. El procedimiento de obtención de los anticuerpos monoclonales de la invención puede realizarse según métodos convencionales, conocidos en el estado de la técnica. Opcionalmente, dichos anticuerpos pueden purificarse por medios convencionales, tales como cromatografía de afinidad, proteína *A-Sepharosa*, cromatografía con hidroxipatito, electroforesis en gel o diálisis.

Tal y como es conocido por el experto en la materia, hay cinco isotipos o clases principales de inmunoglobulinas: inmunoglobulina M (IgM), inmunoglobulina D (IgD), inmunoglobulina G (IgG) (que a su vez presenta los siguientes subtipos en el ratón: IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3), inmunoglobulina A (IgA) e inmunoglobulina E (IgE). Los anticuerpos monoclonales incluidos en la presente invención son: clon B101.37 (IgG1) y clon B143-14 (IgM).

Una realización preferida del primer aspecto de la invención el anticuerpo reconoce específicamente la secuencia SEQ ID NO: 1: Péptido BAMBI(109-133) murino:

LHDVLSPSKSEASGQGNRYQHDSSR o SEQ ID NO: 2: Péptido BAMBI(109-133) humano: LHDVLSPPRGEASGQGNRYQHDGSR.

5 Una realización más preferida del primer aspecto de la invención se refiere al anticuerpo donde dicho anticuerpo está expresado a partir de la línea celular (hibridoma) depositada en una autoridad internacional.

En una realización particular el anticuerpo puede comprender una etiqueta detectable. Una realización aún más preferida del primer aspecto de la invención se refiere al anticuerpo donde dicho anticuerpo está conjugado con un fluorocromo, una enzima, 10 una partícula de oro, una nanopartícula, un péptido u otra proteína de interés, por ejemplo una proteína o péptido ligando de un receptor.

El término "etiqueta detectable" o "marcaje" en la presente invención hace referencia a una etiqueta molecular que permite la detección, localización y/o identificación de la molécula a la que está unido, mediante procedimientos y equipamiento adecuados para la detección, bien mediante medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, 15 inmunoquímicos o químicos. Ejemplos de etiquetas detectables para el marcaje de compuestos incluyen, aunque no se limitan a isótopos radiactivos, sustratos enzimáticos, co-factores, ligandos, agentes quimioluminiscentes, fluoróforos, enzimas (por ejemplo peroxidasa), receptores y combinaciones de éstos. En una realización particular el anticuerpo está marcado con biotina, avidina, estreptoavidina, fosfatasa 20 alcalina o peroxidasa de rábano (HRP). Métodos para el marcaje y guía para la elección de marcajes adecuados para diferentes propósitos son conocidos por el experto en la materia. 25

El anticuerpo monoclonal puede ser alterado bioquímicamente, por manipulación genética o puede ser sintético, puede también carecer de porciones.

30 En una realización más preferida del primer aspecto de la invención el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia SEQ ID NO: 3 y/o una cadena ligera que comprende la secuencia SEQ ID NO: 4.

En otra realización más preferida del primer aspecto de la invención el anticuerpo 35 comprende una cadena pesada que comprende la secuencia SEQ ID NO: 5 y/o una cadena ligera que comprende la secuencia SEQ ID NO: 6.

En una realización preferida el anticuerpo es el anticuerpo denominado en la presente invención como clon B110-37 (IgG1, κ anti-BAMBI) y/o el clon B143-14 (IgM, κ anti-BAMBI).

5

En una realización particular la presente invención también se refiere a una construcción génica que es capaz de generar el anticuerpo del primer aspecto de la presente invención.

10

El término "identidad", tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la proporción de aminoácidos idénticos entre dos péptidos o proteínas que se comparan. Los métodos de comparación de secuencias son conocidos en el estado de la técnica, e incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el programa BLASTP o BLASTN, ClustalW y FASTA. Podemos considerar, que péptidos o proteínas con porcentajes de identidad de, al menos, un 80% mantendrán las mismas propiedades que la secuencia SEQ ID NO: 1.

15

Se entiende por "reconocimiento específico" "unión específica" a la unión (reacción, interacción o unión específica) entre el anticuerpo de la invención y la secuencia descrita en el primer aspecto de la invención.

20

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un antisuero que comprende el anticuerpo del primer aspecto de la invención.

25

El término "antisuero" se refiere a un suero obtenido tras la inmunización de un animal con un inmunógeno. El antisuero comprende anticuerpos específicos de dicho inmunógeno generados tras la respuesta inmune producida en el animal. En el contexto de la presente invención el inmunógeno es el péptido con al menos un 80% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1 (preferiblemente un 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100%), preferiblemente SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, y el antisuero comprende anticuerpos monoclonales específicos generados frente a dicha secuencia.

30

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a una célula que expresa el anticuerpo del primer aspecto de la invención (hibridoma).

35

Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere al uso del anticuerpo del primer aspecto de la invención o del antisuero del segundo aspecto de la invención para la inhibición de *BMP and Activin Membrane Bound Inhibitor* (BAMBI).

- 5 Un quinto aspecto de la presente invención se refiere al uso del anticuerpo del primer aspecto de la invención o del antisuero del segundo aspecto de la invención para la elaboración de un medicamento.

- 10 Un sexto aspecto de la presente invención se refiere al uso del anticuerpo del primer aspecto de la invención o del antisuero del segundo aspecto de la invención para la elaboración de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades autoinmunes.

- 15 Se entiende por “enfermedad autoinmune” en la presente invención aquella enfermedad en la que las células del sistema inmune desencadenan una respuesta inflamatoria crónica en uno o varios tejidos del individuo provocando su deterioro o incluso destrucción. En la presente invención los términos “enfermedad autoinmune” y “enfermedad inflamatoria crónica” se utilizan indistintamente.

- 20 La enfermedad autoinmune es preferiblemente artritis autoinmune, enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, espondiloartritis o lupus eritematoso sistémico. En una realización aún más preferida la artritis autoinmune es artritis de reciente comienzo o artritis reumatoide.

- 25 Por este motivo, en una realización más preferida del sexto aspecto de la invención las enfermedades autoinmunes se seleccionan de la lista que consiste en: artritis autoinmune, espondiloartritis, psoriasis, lupus eritematoso sistémico y enfermedad inflamatoria intestinal. Preferiblemente la enfermedad inflamatoria intestinal es colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn.

- 30 En la presente invención el término “artritis autoinmune” engloba tanto los términos “Artritis Reumatoide” como “Artritis Indiferenciada” tanto si es de reciente comienzo como si está bien establecida.

- 35 Se entiende por “Artritis de Reciente Comienzo” (ARC) (o artritis de inicio) en la presente invención, aquella enfermedad consistente en inflamación de al menos una

articulación, de menos de un año de evolución que cumple los criterios preestablecidos por el Colegio Americano de Reumatología (*American College of Rheumatology* o ACR) y EULAR de “Artritis reumatoide o AR” (Aletaha, Neogi *et al.* Ann Rheum Dis 2010;69:1580-1588) o, que sin cumplir dichos criterios, no cumple criterios de otras enfermedades autoinmunes, degenerativas o metabólicas que puedan explicar los síntomas. Este último caso, viene siendo denominado “Artritis Indiferenciada” (AI) que, en muchos de los casos, dejados a su libre evolución, acaban desembocando en una AR. En esta invención los términos ARC, AR o AI hacen referencia a una enfermedad sistémica autoinmune crónica y progresiva, la cual provoca la inflamación crónica fundamentalmente de las articulaciones, y que dada su naturaleza progresiva, produce la destrucción de las mismas, con su consecuente deformación y pérdida de capacidad funcional. Además, esta enfermedad puede provocar alteraciones extraarticulares en diversos órganos.

Se entiende por “espondiloartritis” en la presente invención como aquellas enfermedades autoinmunes con afectación axial y/o periférica que cumplen los criterios de clasificación de la *Assessment of SpondyloArthritis International Society* (ASAS o Sociedad Internacional de Evaluación de Espodiloartritis) (Rudwaleit *et al.* Ann Rheum Dis 2011;70:25-31).

Se entiende por “lupus eritematoso sistémico” en la presente invención aquella enfermedad autoinmune sistémica definida por los criterios del Colegio Americano de Reumatología (Tan *et al.* Arthritis Rheum 1982;25:1271-1277).

El término “enfermedad inflamatoria intestinal” o “EII” en la presente invención se refiere a la inflamación crónica del intestino en un individuo, donde dicha inflamación es debida al sistema inmune del propio individuo. Las dos formas más frecuentes corresponden a la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn. Por lo que en una realización preferida la enfermedad autoinmune es colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn.

En la presente invención se entiende por “psoriasis” aquella enfermedad cutánea la cual está caracterizada por un mal funcionamiento del sistema inmune, lo que provoca un exceso de producción de células cutáneas. Esta enfermedad da lugar a la formación de abultamientos rojizos cubiertos de descamaciones. Además, el exceso de producción de células también produce la infiltración de glóbulos blancos en la piel.



Las lesiones de forma general se localizan en regiones con un mayor rozamiento, como por ejemplo, aunque sin limitarse, los codos, las rodillas o ingles.

5 Un séptimo aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo monoclonal del primer aspecto de la invención o del antisuero del segundo aspecto de la invención.

10 El término "composición farmacéutica" en esta memoria hace referencia a cualquier sustancia usada para diagnóstico, prevención, alivio, tratamiento o curación de una enfermedad en el ser humano o en los animales. La composición farmacéutica de la invención puede utilizarse tanto sola como en combinación con otras composiciones farmacéuticas. En una realización preferida, la composición farmacéutica además comprende un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

15 El término "excipiente" hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de la composición farmacéutica, que comprende el anticuerpo de la invención, la estabiliza o ayuda en su preparación en el sentido de darle una consistencia, forma, sabor o cualquier otra característica funcional específica. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes unidos como por ejemplo almidones, 20 azúcares o celulosas, función de endulzar, función de colorante, función de protección como por ejemplo para aislarlo del aire y/o la humedad, función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación como por ejemplo el fosfato de calcio dibásico, función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo.

25 Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" (o "farmacológicamente aceptable") se refiere a aquellas sustancias, o combinación de sustancias, conocidas en el sector farmacéutico, utilizadas en la elaboración de formas farmacéuticas de administración e incluye, pero sin limitarse, sólidos, líquidos, disolventes o tensioactivos. El vehículo 30 puede ser una sustancia inerte o de acción análoga a cualquiera de los compuestos de la presente invención y cuya función es facilitar la incorporación del fármaco así como también de otros compuestos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición farmacéutica. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo es el diluyente. El término "farmacológicamente 35 aceptable" se refiere a que el compuesto al que hace referencia esté permitido y evaluado de modo que no cause daño a los organismos a los que se administra.

La composición farmacéutica de esta invención puede ser facilitada por cualquier vía de administración, para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida.

5

Un octavo aspecto de la presente invención se refiere a uso *in vitro* del anticuerpo del primer aspecto de la invención o del antisuero del segundo aspecto de la invención para el cribado de fármacos, preferiblemente fármacos dirigidos al tratamiento y/o prevención de enfermedades autoinmunes. Preferiblemente las enfermedades autoinmunes se seleccionan de la lista que consiste en: artritis autoinmune, espondiloartritis, psoriasis, lupus eritematoso sistémico y enfermedad inflamatoria intestinal. Más preferiblemente la enfermedad inflamatoria intestinal es colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn.

10

15

El término "in vitro" se refiere a que el método de la invención se realiza fuera del cuerpo del sujeto. Es decir, se realiza en una muestra biológica de un sujeto.

20

El término "muestra biológica" en la presente invención se refiere a cualquier muestra que permita el cribado de fármacos, e incluye, pero sin limitarnos, fluidos biológicos o tejidos de un individuo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia que sirva para tal fin. La muestra biológica podría ser, por ejemplo, pero sin limitarse, una muestra de fluido, como sangre, plasma, suero o tejido. La muestra biológica en la presente invención puede ser fresca, congelada, fijada o fijada y embebida en parafina.

25

En la presente invención los términos "sujeto" e "individuo" se usan indistintamente.

30

Un noveno aspecto de la presente invención se refiere a un método de obtención de un anticuerpo monoclonal que reconoce una secuencia de aminoácidos que comprende un péptido con al menos un 80% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1 que comprende:

35

- a. obtener el suero previamente extraído de un animal no-humano inmunizado con una proteína recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende un péptido con al menos un 80% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1,

- b. obtener un hibridoma a partir del suero que genere anticuerpos monoclonales específicos frente a una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia con al menos un 80% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1.

5

En una realización más preferida del noveno aspecto de la invención el método comprende además una etapa (c) de aislamiento del anticuerpo monoclonal a partir del hibridoma generado en la etapa (b).

10

En otra realización más preferida del noveno aspecto de la invención en la etapa (a) la secuencia de aminoácidos es la secuencia SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

15

En una realización aún más preferida del sexto aspecto de la invención el animal no humano es un mamífero que se selecciona de la lista que consiste en cerdo, chimpancé, ratón, rata, conejo y cobaya.

20

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

25

**FIG. 1:** Caracterización de los AcMs anti-BAMBI(109-133) murino B101.37 y B143-14. A) Especificidad de los AcMs anti-BAMBI B101.37 y B143-14 evaluada por *Western Blot* en lisados de membranas celulares de corazón de ratones B6 normales y B6.BAMBI-KO. B) Reconocimiento de BAMBI humano por el AcM B101.37 evaluado por *Western Blot* en lisados de membranas celulares de corazón humano. DC) Secuencia de las CDR de las cadenas pesadas y ligeras de los AcMs B101.37 y B143-14. Se indica el reordenamiento VDJ y VJ de las cadenas pesadas y ligeras, respectivamente, de ambos AcMs.

35

**FIG. 2:** Inducción de la expresión de BAMBI en linfocitos T CD4+ murinos y humanos tras su activación. A) Análisis comparativo por citometría de flujo de la expresión de

BAMBI en linfocitos T CD4+ de ratones B6 normales y B6.BAMBI-KO antes y 48 horas tras su activación *in vitro* con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 en presencia o ausencia de TGF $\beta$  o IL-2 (paneles superiores). En los paneles inferiores se compara la tinción con B101-37 de los linfocitos T CD4+ activados de ratones B6.BAMBI-KO con la de un IgG1 control isotípico en linfocitos T CD4+ activados de ratones normales. B) Inducción de BAMBI en linfocitos T humanos estimulados *in vitro* durante 48 horas con AcMs anti-CD3 y anti-CD28. La expresión de BAMBI se analizó por *Western Blot* en lisados de membrana plasmática. Como control de carga se comparó la expresión de N-Ras en los mismos lisados.

**FIG. 3:** Efecto de la inhibición de BAMBI en la diferenciación *in vitro* de los linfocitos T CD4+ murinos y humanos a célula Treg y TH17. A) Células T CD4+CD25-CD62L+CD44- naïve de ratones B6 normales y BAMBI-KO fueron estimuladas durante 5 días con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 en condiciones polarizantes Treg (paneles superiores) o TH17 (paneles inferiores) en presencia del AcM B143-14 (IgM anti-BAMBI) o una IgM de ratón policlonal (Sigma). Se muestra los porcentajes de células CD4+FoxP3+ y CD4+IL-17+ en las regiones seleccionadas analizados mediante citometría de flujo. C y D) Linfocitos T CD4+ naïve (en la diferenciación Treg) o memoria (en la diferenciación TH17) humanos, purificados por separación magnética, fueron activados *in vitro* durante 10 días con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 conjugados a bolas en condiciones de diferenciación TH0, Treg o TH17. Se muestra el efecto de la inhibición de BAMBI con el AcM B143-14 en la diferenciación a células Tregs (C) y TH17 (D). Al igual que en (A) se utilizó la IgM de ratón policlonal como control negativo. Los porcentajes de cada una de las poblaciones CD4 analizadas se determinaron mediante citometría de flujo. Las diferencias estadísticas se representan como: \*\*p<0,01.

**FIG. 4:** El AcM B101-37 inhibe el desarrollo de artritis en el modelo de CIA. A y B) Para la inducción de CIA los ratones B10R/III normales fueron inmunizados con colágeno de tipo II bovino emulsionado en CFA. Los diferentes grupos experimentales recibieron tratamientos con 2 mg/ratón/semana, 0,3 mg/ratón/semana de B101-37 o con 2 mg/ratón/semana de una IgG1 murina irrelevante (IgG1-C) durante las primeras 4 semanas tras la inmunización. Se muestra el grado de severidad clínica de cada ratón (A) y de distintas lesiones radiológicas (media  $\pm$  SD) asociadas a destrucción articular a la 8ª semana tras la inmunización (B). Como controles de los experimentos anteriores se comparó el desarrollo de CIA entre ratones B10R/III normales y BAMBI-

KO. Se muestra la evolución de la severidad clínica de la artritis en estos animales expresada como media  $\pm$  SD. (C) y de distintas lesiones radiológicas (media  $\pm$  SD) asociadas a destrucción articular a la 8ª semana tras la inmunización (D). Las diferencias estadísticas se representan como: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

5

**FIG. 5:** Efecto del tratamiento con B101-37 en el desarrollo de artritis psoriásica inducida por inyección de manano. A) Ratones B10RIII normales o BAMBI-KO tratados o no desde el inicio del experimento con el AcM B101-37 (2 mg/ratón/semana) recibieron una inyección i.p. de 10 mg de Manano obtenido de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Se representa la evolución en la severidad de la artritis y en el porcentaje de incremento en el grosor de las orejas (media  $\pm$  SD) en los diferentes grupos experimentales. B) Fotografías representativas del aspecto macroscópico del pabellón auricular de los grupos experimentales descritos en (A). Las diferencias estadísticas se representan como: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

10

15

**FIG. 6:** Efecto del tratamiento con B101-37 en el desarrollo de colitis DSS. Ratones B6 normales o BAMBI-KO tratados o no desde el inicio del experimento con el AcM B101-37 (2 mg/ratón/semana) recibieron DSS disuelto al 3% en el agua del biberón durante 5 días. La severidad de la colitis fue evaluada mediante cuantificación del DAI (A) o analizando el acortamiento del colon (B). C) Mortalidad en los diferentes grupos experimentales. Las diferencias estadísticas se representan como: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

20

## EJEMPLOS

25

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

## MATERIAL Y METODOS.

30

### Obtención y caracterización de los anticuerpos monoclonales anti-BAMBI murinos:

35

Ratones B6.BAMBI-KO fueron inmunizados con el péptido BAMBI(109-133) murino conjugado a *keyhole limpet hemocyanin* (KLH) y emulsionado en adyuvante completo de Freund (CFA). Los ratones fueron inmunizados en dos ocasiones más (con un mes de diferencia entre cada inmunización) con el mismo péptido emulsionado en

adjuvante incompleto de Freund (IFA). El péptido BAMBI(109-133) murino se localiza en la región extracelular de BAMBI y difiere con su homólogo humano en 4 aminoácidos (posiciones 8, 9, 10 y 23 de la SEQ ID NO: 1). La presencia de anticuerpos circulantes anti-BAMBI(109-133) murino en los ratones inmunizados fue evaluada 15 días tras cada inmunización mediante ELISA. Los ratones con títulos más altos de estos anticuerpos fueron utilizados para la obtención de los anticuerpos monoclonales (AcM) anti-BAMBI murino. Para ello, suspensiones celulares de bazo se fusionaron con la línea de mieloma no secretor SP2/O-Ag14 tal y como se ha descrito anteriormente (24). Los hibridomas productores de AcM anti-BAMBI humano fueron seleccionados por inmunoensayo enzimático (ELISA). En la presente invención se han caracterizado dos de los AcM obtenidos; el clon B110-37 (IgG1,  $\kappa$  anti-BAMBI) y el clon B143-14 (IgM,  $\kappa$  anti-BAMBI). La especificidad de los AcM fue evaluada posteriormente mediante *Western Blot* en lisados de membranas celulares de corazones procedentes de ratones B6 normales y B6.BAMBI-KO y de muestras de miocardio humano obtenidas de biopsias quirúrgicas.

El ácido ribonucleico (ARN) de los AcM B110-37 y B143-14 fue aislado mediante el kit comercial *RNeasy Mini Kit* (Qiagen). Para definir las secuencias codificantes para las regiones determinantes de complementariedad (CDR) en la cadena pesada y ligera de ambos AcMs se realizaron RT-PCRs a partir de los RNAs purificados, tal y como se ha descrito previamente (25). Para definir el CDR de la cadena pesada de B110-37 se utilizaron los siguientes amplímeros: amplímero 5' degenerado de la región FR1 de la cadena pesada: 5'-CTT CCG GAA TTC SAR GTN MAG CTG SAG SAG TC-3 (SEQ ID NO: 7)'; amplímero 3' de la región constante de IgG1: 5'-GGA AGA TCT ATA GAC AGA TGG GGG TGT CGT TTT GGC-3' (SEQ ID NO: 8). Para definir el CDR de la cadena pesada de B143-14 se utilizaron el amplímero degenerado de la región FR1 de la cadena pesada mencionado anteriormente y el amplímero 3' de la región constante de IgM: 5'-GGA AGA TCT GAC ATT TGG GAA GGA CTG ACT CTC-3' (SEQ ID NO: 9). Para definir el CDR de la cadenas ligeras de B110-37 y B143-14 se utilizaron los siguientes amplímeros: amplímero degenerado de la región FR1 de la cadena ligera  $\kappa$ : 5'-GG GAG CTC GAT ATT GTG MTS ACM CAR WCT MCA-3' (SEQ ID NO: 10); amplímero 3' de la región constante de la cadena ligera  $\kappa$ : 5'-GGT GCA TGC GGA TAC AGT TGG TGC AGC ATC-3' (SEQ ID NO: 11). Los productos de PCR fueron posteriormente secuenciados (STABVida, Caparica, Portugal) y las secuencias analizadas mediante el programa IgBLAST.

**Estudio de la expresión de BAMBI en linfocitos T CD4 murinos y humanos.**

Se estudió mediante citometría de flujo la expresión of BAMBI en linfocitos T CD4+ de ratones B6 normales tras su estimulación utilizando en AcM B101.37 biotinilado. Los  
 5 linfocitos T CD4+ aislados del bazo de ratones B6 normales fueron estimulados *in vitro* durante 48 horas con anticuerpos anti-CD3 (1 µg/pocillo) y anti-CD28 (0,5 µg/pocillo) unidos a la placa en presencia o ausencia de 2 ng/ml of TGFβ murino recombinante y/o 1 ng/ml of IL-2 murino recombinante (PeproTech, Londres). Como controles negativos se utilizaron células de bazo de ratones B6.BAMBI-KO estimuladas de igual  
 10 forma y coloreadas con B101.37 biotinilado y de ratones B6 normales coloreadas un control isotípico IgG1 biotinilado. Las células coloreadas fueron analizadas en un citómetro FACSCanto II equipado con el software FACSDiva (BD Biosciences).

La expresión de BAMBI en células T CD4+ humanas tras su estimulación *in vitro* se  
 15 analizó mediante *Western Blot*. Dichos linfocitos fueron purificados a partir de 50 ml de *buffy-coats* procedentes de donantes sanos del Banco de Sangre y Tejidos de Cantabria (Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander). Las células mononucleadas obtenidas tras gradiente de Ficoll se sometieron a una selección positiva tras marcaje con AcM específico de CD4 conjugado a micropartículas  
 20 magnéticas (MACS) utilizando un separador magnético (AutoMACS, Miltenyi Biotec). Los linfocitos T CD4+ fueron posteriormente estimulados *in vitro* durante 48 horas con anticuerpos anti-CD3 (1 µg/pocillo) y anti-CD28 (0,5 µg/pocillo) unidos a la placa de cultivo. Los lisados de las membranas celulares de los linfocitos activados se obtuvieron tal y como se ha descrito anteriormente.

25 Cultivos de diferenciación *in vitro* de linfocitos T CD4+ murinos y humanos a células Treg y TH17.

La capacidad inhibitoria de los AcM anti-BAMBI dirigidos contra el péptido BAMBI(109-  
 30 133) se exploró *in vitro* en cultivos de linfocitos T CD4+ murinos y humanos diferenciados a células Treg y TH17. En estos experimentos se utilizó el AcM B143-14. En los experimentos con linfocitos murinos, se purificaron células CD4+ *naïve* (CD4+CD25-CD62L+CD44-) de los bazos de ratones B6 normales mediante *cell sorting* (FACS Aria, BD Biosciences). 5 x 10<sup>5</sup> células CD4+ *naïve* se estimularon  
 35 durante 5 días con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 unidos al plástico de la placa e cultivo, en condiciones polarizantes Treg (2 ng/ml de TGFβ murino) o TH17 (1 ng/ml

de TGF $\beta$  murino y 10 ng/ml de IL-6 murino IL-6) en presencia de 20  $\mu$ g/ml B143-14 o 20  $\mu$ g/ml of IgM murina (Sigma, St Louis, Missouri) como control isotópico. Los porcentajes de linfocitos TCD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> (Treg) y CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> (TH17) al final del cultivo se analizaron mediante citometría de flujo, tal y como hemos descrito anteriormente (21).

Linfocitos T CD4<sup>+</sup> humanos *naïve* (en la diferenciación Treg) o memoria CD45RO<sup>+</sup> (en la diferenciación TH17), purificados por separación magnética, fueron activados *in vitro* durante 10 días con anticuerpos (Acs) anti-CD3 y anti-CD28 conjugados a bolas en condiciones de diferenciación Treg (5 ng/ml de TGF $\beta$ ) o TH17 (20 ng/ml de IL-1 $\beta$ , 30 ng/ml de IL-6, 30 ng/ml de IL-23, 3 ng/ml de TGF $\beta$ 1, 1  $\mu$ g/ml de anti-IFN $\gamma$  y 2,5  $\mu$ g/ml de anti-IL-4), en presencia de 20  $\mu$ g/ml B143-14 o 20  $\mu$ g/ml of IgM murina. Los porcentajes de linfocitos TCD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> (Treg) y CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> (TH17) al final del cultivo se analizaron mediante citometría de flujo.

#### **Modelo experimental de artritis tras inmunización con colágeno de tipo II bovino emulsionado en CFA (CIA).**

Grupos de 10 ratones B10RIII (MHC H-2r) deficientes o no en BAMBI fueron inmunizados antes de la 12<sup>a</sup> semana de edad por vía intradérmica en la base de la cola con 150  $\mu$ g de colágeno de tipo II bovino (MD Biosciences, Zurich) emulsionado (vol. 1/1) en CFA conteniendo una concentración de *Mycobacterium tuberculosis* de 4 mg/ml (MD Biosciences), tal y como hemos descrito anteriormente (21). Para estudiar el efecto de la inhibición BAMBI en el desarrollo de CIA los ratones B10RIII normales inmunizados fueron tratados intraperitonealmente (i.p.) durante las primeras 4 semanas tras la inmunización con 2 o 0,3 mg/semana de B101.37 o con 2 mg/semana de una IgG1 anti-TNP usada como control isotópico (IgG1-C). La evolución de la artritis fue monitorizada semanalmente desde la 3<sup>a</sup> (fecha de comienzo de la artritis) a la 8<sup>a</sup> semana después de la inmunización. La severidad de la artritis se evaluó en cada una de las cuatro extremidades mediante el método descrito por Wooley y cols (26). Así mismo, a las 8 semanas de la inmunización se evaluaron las lesiones articulares en las patas delanteras y traseras mediante radiología, tal y como hemos descrito anteriormente (21).

#### **Modelo experimental de colitis por sulfato de dextrano (colitis-DSS).**



Para la inducción de colitis, el DSS (MPbio.com) se disolvió en agua al 3%. Esta disolución (con cambios diarios del agua) se suministró en el biberón a los ratones de los diferentes grupos experimentales durante un periodo de tiempo variable [hasta que los ratones del grupo control alcancen un índice de actividad de la enfermedad (DAI) de entre 1,5-2 (aproximadamente 4-5 días)]. Diariamente se midió el agua consumida por cada grupo experimental y se valoró el DAI calculando el score clínico de los siguientes parámetros: A) pérdida de peso: 0= no hay pérdida de peso, 1= pérdida del 1-5 % de peso, 2= pérdida del 5-10 % de peso, 3= pérdida del 10-20 % de peso y 4= pérdida de más del 20% de peso; B) consistencia de las heces (se otorga el mismo valor a todos los animales que estén en la misma caja): 0= heces de consistencia normal, 2= heces blandas y 4= diarrea; C) sangrado rectal (se otorga el mismo valor a todos los animales que estén en la misma caja): 0= no hay sangrado, 2= sangrado leve y 4= sangrado intenso. El valor de DAI final se calculó sumando los valores de los diferentes parámetros y dividiéndolo por 3.

#### **Inducción de artritis psoriásica con manano.**

Para la inducción de artritis psoriásica grupos de ratones B10RIII deficientes o no en BAMBI recibieron una inyección i.p. de 10 mg de manano obtenido de la levadura *S. cerevisiae* (Sigma–Aldrich) disuelto in 200 µl de PBS (27). Para estudiar el efecto de la inhibición BAMBI en el desarrollo de artritis psoriásica los ratones fueron tratados desde el momento de la administración del manano con 2 mg/semana de B101.37 o con 2 mg/semana de una IgG1 anti-TNP usada como IgG1-C. Las lesiones de psoriasis se valoraron a nivel de los pabellones auriculares cuantificando el grosor de los mismos con ayuda de un calibrador digital. La severidad de la artritis se evaluará en cada una de las cuatro patas, en una escala de 0-10 (rango total de 0-40) de la siguiente forma: inflamación severa de carpo/tarso= 5 puntos sumándose 1 punto adicional por cada dedo inflamado. Si la inflamación es leve= 3 puntos por carpo/tarso + 0,5 puntos por cada dedo inflamado.

#### **Ejemplo 1: Caracterización molecular de los AcM anti-BAMBI.**

La especificidad de los AcM anti-BAMBI B110-37 y B143-14 se determinó inicialmente mediante ELISA (durante el proceso de cribado de los hibridomas) y posteriormente mediante *Western Blot*. Ambos AcM reconocen una banda de aproximadamente 27-29 kDa y otra de aproximadamente 54 kDa, compatibles con monómeros de BAMBI y

dímeros resistentes a dodecil sulfato sódico (SDS) y condiciones reductoras, tal y como ha sido descrito previamente (Xavier S *et al.* 2010 PLoS One 5:e12995), en los lisados de los ratones B6 pero no en los de los ratones B6.BAMBI-KO (Figure 1A).

5 Aunque el péptido BAMBI(109-133) murino utilizado para el desarrollo de los AcM anti-BAMBI difiere de su homólogo humano en 4 aminoácidos, estudios de *Western Blot* en lisados de membrana plasmática de miocardio indican que B110-37 también reconoce a BAMBI humano (Figura 1B).

10 Posteriormente, caracterizamos las CDRs de las cadenas pesadas y ligeras de ambos AcM anti-BAMBI mediante secuenciación del ácido desoxirribonucleico (DNA) (SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6). La comparación de las secuencias de DNA con la base de datos IgBLAST indica que las CDR de las cadenas pesada y ligera del AcM B110-37 son el resultado del reordenamiento de los  
15 segmentos V9-3/D1-3/J1 y V15-103/J5, respectivamente, mientras que las CDR de las cadenas pesada y ligera del AcM B143-14 son el resultado del reordenamiento de los segmentos V1-55/D4-1/J2 y V5-43/J1, respectivamente.

## **Ejemplo 2: Expresión de BAMBI en los linfocitos T CD4+.**

20

Los linfocitos T CD4+ desempeñan un papel fundamental en el desarrollo de patologías inflamatorias y autoinmunes. Por este motivo se estudió la regulación de la expresión de BAMBI en esta población linfocitaria en ratones mediante citometría de flujo y posteriormente en humanos mediante *Western Blot*, utilizando en ambos casos  
25 el AcM B101.37. En linfocitos T CD4+ *naïve* murinos no se detectó la expresión de BAMBI pero se indujo 48 horas tras su estimulación *in vitro* con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (Figura 2A). Esta expresión se incrementó tras la adición de TGFβ, pero no IL-2, a las células T CD4+ activadas (Figura 2A). Como controles de especificidad del AcM B101.37, no se detectó marcaje en citometría de flujo tanto en los linfocitos T  
30 CD4+ activados de los ratones BAMBI-KO coloreados B101.37 como en los de los ratones B6 normales coloreados con un control isotópico IgG1, respectivamente (Figura 2A, paneles inferiores).

Al igual que en el ratón, la expresión de BAMBI fue muy baja en los linfocitos CD4+  
35 *naïve* humanos, induciéndose tras su estimulación con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (Figura 2B).

La inhibición de BAMBI con el AcM anti-BAMBI(109-133) murino B143-14 altera la diferenciación *in vitro* de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de ratón y humanos a los subtipos Treg y TH17.

5

En estudios previos demostramos que la ausencia de BAMBI en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de los ratones BAMBI-KO potenciaba e inhibía su diferenciación *in vitro* a las poblaciones Treg y TH17, respectivamente (Postigo J *et al.* Tesis doctoral defendida el 19 de abril de 2013, Universidad de Cantabria)). Para valorar el efecto inhibitorio de los AcM anti-BAMBI dirigidos contra el epítipo BAMBI(109-133) murino, analizamos la capacidad de B143-14 para alterar la diferenciación funcional de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de ratones normales en el mismo sentido que lo observado en los ratones BAMBI-KO. Para ello, linfocitos T CD4<sup>+</sup> *naïve* de ratones B6 normales y BAMBI-KO fueron activados *in vitro* en condiciones de polarización a célula Treg o TH17, en presencia del AcM B143-14 o de una IgM murina usada como control isotípico. Al igual que lo observado con los linfocitos de los ratones BAMBI-KO, la inhibición de BAMBI tras la adición al cultivo de B143-14, pero no de la IgM control, incrementó y redujo la diferenciación Treg y TH17 *in vitro*, respectivamente, de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de ratones B6 normales (Figura 3A).

20

Finalmente, observamos que en presencia del AcM B143-14, pero no de la IgM control, la diferenciación *in vitro* de linfocitos T CD4<sup>+</sup> *naïve* (a Treg) o de memoria (a TH17) humanos, activados en condiciones polarizantes hacia Treg (Figura 3B) o TH17 (Figura 3C) se altera en el mismo sentido que en el ratón: incremento de Treg y disminución de TH17.

25

### **Ejemplo 3: Efecto terapéutico del AcM B101.37 en el desarrollo de CIA, artritis psoriásica y colitis-DSS.**

Los resultados precedentes indican que: 1) disponemos de AcMs capaces de reconocer a BAMBI en el ratón y en humanos, 2) la expresión de BAMBI se induce en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> tras su activación tanto en el ratón como en humanos; y 3) en ambas especies la inhibición de BAMBI *in vitro* con un AcM anti-BAMBI(109-133) murino altera la diferenciación funcional los linfocitos T CD4<sup>+</sup> en el mismo sentido que lo descrito en los ratones B6.BAMBI-KO (incremento de células Treg y disminución de

35

TH17). Estos hallazgos plantean la posibilidad de que la inhibición de BAMBI *in vivo* tenga un efecto terapéutico en patologías inflamatorias/autoinmunes.

5 En la presente invención hemos caracterizado el potencial terapéutico de B101.37 en el desarrollo de CIA (el modelo experimental de artritis reumatoide más empleado por la comunidad científica), artritis psoriásica y colitis-DSS.

10 Tanto desde el punto de vista clínico como radiológico, el tratamiento de los ratones B10RIII normales con 2 mg/semana de B101.37 durante las primeras 4 semanas tras la inmunización con colágeno de tipo II bovino inhibió el desarrollo de CIA en estos animales, a diferencia de lo observado en los ratones tratados con 0,3 mg/semana de B101.37 o con 2 mg/semana de IgG1-C (Figuras 4A y 4B). La inhibición de la CIA tras el tratamiento con la dosis alta de B101.37 fue similar al observado en los ratones B10RIII.BAMBI-KO inmunizados (Figuras 4C y 4D).

15 Al igual que en el modelo de CIA, el tratamiento con 2 mg/semana de B101.37 desde el momento de la administración de manano a los ratones B10RIII normales redujo de forma muy significativa la severidad de las lesiones articulares y cutáneas en este modelo experimental de artritis psoriásica, de forma similar a lo observado en los B10RIII.BAMBI-KO (Figura 5).

20 Por último, valoramos el efecto terapéutico de B101.37 en el modelo experimental de colitis-DSS. Al igual que en los ratones B6.BAMBI-KO, los ratones B6 normales tratados con 2 mg/semana de B101.37 desde el momento de la administración de DSS desarrollaron una colitis significativamente menos severa que los controles no tratados (Figura 6A). Sin embargo, el efecto protector del tratamiento con B101.37 en los ratones B6 no fue tan importante como el observado en los animales BAMBI-KO, sobre todo en lo que respecta al grado de acortamiento del colon (Figura 6A, panel derecho). Cabe destacar que tanto en los animales B6 tratados con B101.37 como en los ratones BAMBI-KO se previno completamente la mortalidad asociada a la inducción de colitis-DSS (Figura 6B).

30 Por lo tanto, en la presente invención se demuestra el uso de anticuerpos frente a BAMBI para el tratamiento y prevención de enfermedades autoinmunes.

35

## REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente una secuencia de aminoácidos que comprende un péptido con al menos un 80% de identidad con SEQ ID NO: 1, donde el tamaño de dicha secuencia de aminoácidos es de entre 15 y 30 aminoácidos.
2. Anticuerpo según la reivindicación 1 donde dicho anticuerpo reconoce específicamente la secuencia SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.
3. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia SEQ ID NO: 3 y/o una cadena ligera que comprende la secuencia SEQ ID NO: 4.
4. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia SEQ ID NO: 5 y/o una cadena ligera que comprende la secuencia SEQ ID NO: 6.
5. Antisero que comprende el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. Célula que expresa el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
7. Uso del anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o del antisuero según la reivindicación 5 para la inhibición de *MBP and Activin Membrane Bound Inhibitor* (BAMBI).
8. Uso del anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o del antisuero según la reivindicación 5 para la elaboración de un medicamento.
9. Uso del anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o del antisuero según la reivindicación 5 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades autoinmunes.

10. Uso según la reivindicación 9 donde las enfermedades autoinmunes se seleccionan de la lista que consiste en: artritis autoinmune, espondiloartritis, psoriasis, lupus eritematoso sistémico y enfermedad inflamatoria intestinal.
- 5 11. Uso según la reivindicación 10 donde la enfermedad inflamatoria intestinal es colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn.
12. Composición farmacéutica que comprende el anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o el antisuero según la reivindicación 5.
- 10 13. Uso *in vitro* del anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o del antisuero según la reivindicación 5 para el cribado de fármacos.
14. Método de obtención de un anticuerpo monoclonal que reconoce una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia con al menos un 80% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1 que comprende:
  - 15 a. obtener el suero previamente extraído de un animal no-humano inmunizado con una proteína recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende un péptido con al menos un 80% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1,
  - 20 b. obtener un hibridoma a partir del suero que genere anticuerpos monoclonales específicos frente a una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia con al menos un 80% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1.
- 25 15. Método según la reivindicación 14, que comprende además una etapa (c) de aislamiento del anticuerpo monoclonal a partir del hibridoma generado en la etapa (b).
- 30 16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 14 o 15 donde en la etapa (a) la secuencia de aminoácidos es la secuencia SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.
17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, donde el animal no-humano es un mamífero que se selecciona de la lista que consiste en cerdo, chimpancé, ratón, rata, conejo y cobaya.
- 35

.....

Fig. 1 A

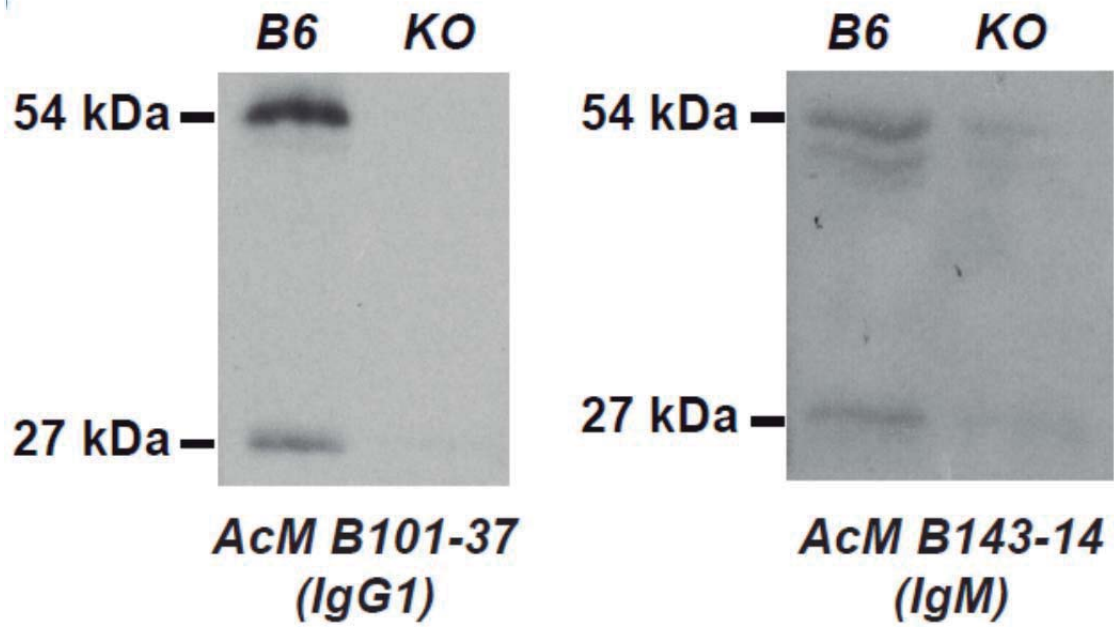


Fig. 1 B

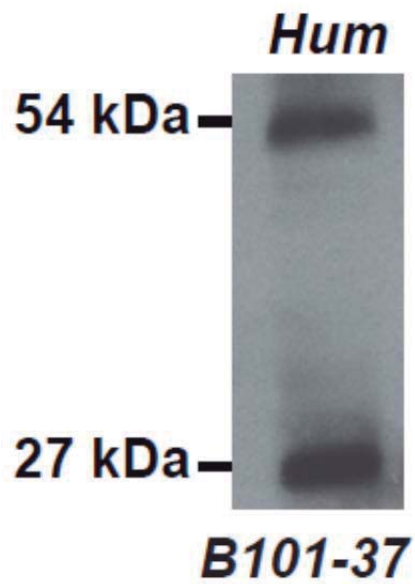


Fig. 1 B

**AcM B101-37****Cadena Pesada: IgHV9-3/D1-3/J1**

CAGCTGGAGCAGTCAGGACCTGAGCTGAAGAGGCCCTGGAGAGACAGTCAAGTTCTCCTGCAAGGCTTCTGGGT  
 ATCCCTTCACAAACTATGGAATGCACTGGGTGAACAGGCTCCAGGAAAGGTTTAAAGTGGATGGCTGGATAA  
 ACACCCACACTGGAGAGCCAAACATATGCTGATGACTTCAGGGGACGGTTTGCCCTTCTCTTTGGAAACCTCTGCCA  
 GCACTGCCTATTTGCAGATCAACAACCTCAAAATGAGGACACGGCTACATATTTCTGTGCAAGAGAGGGTTATTAT  
 AACTACGAAGGCTGGTACTTCCGATGCTGGGGCGCAGGGACACGGTCAACCGTCTCCTCAGCCAAACGACACC  
 CCCATCTGCTATAGATCTTCC

**Cadena Ligera ( $\kappa$ ): Ig $\kappa$ V15-103/J5**

GGGAGCTCGACATTGTGCTGACCCAGTCTCCATCCAGTCTGTCTGCATCCCTTGGAGACACAATTACCATCACTTG  
 CCATGCCAGTCAGAAACATTTATTTTGGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCCAGGAAATATTCCTAAACTATTGATCTAT  
 AAGGCTTCCAACTTGACACACAGGCGTCCCATCAAGGTTTAGTGGCAGTGGATCTGGAACAGGTTTCACATTAAACCA  
 TCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGACATTGCCACTTACTACTGTCAACAGGGTCAAAAGTTATCCGCTCACGTTCCGGTGC  
 TGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCGCATGCACC

**AcM B143-14****Cadena Pesada: IgHV1-55/D4-1/J2**

CTTCCGGAATCCAAGTTCAGCTGGAGGAGTCAGGGGCTGAGCTTGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTCC  
 TGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATAAACTGGGTGAAGCTGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGT  
 GGATTGGAGATATTTATCCTGCTAGTGGTAGTACTAACTACAATGAGAACTTCAAGAGCAAGGCCACACTGACTGTAG  
 ACACATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAACT  
 GGGTTTGACTACTGGGGCCAAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGAGAGTCAGTCTCTCCCAAATGTCAGATCTT  
 CC

**Cadena Ligera ( $\kappa$ ): Ig $\kappa$ V5-43/J1**

GGGAGCTCGACATTGTGCTACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGACTCCAGGAGATAGCGTCAGTCTTTCCCTG  
 CAGGGCCAGCCAAAGTATTAGCAACAACCTACACTGGTATCAACAAAAATCACATGAGTCTCCAAGGCTTCTCATCAA  
 GTATGCTTCCAGTCCATCTCTGGGATCCCTCCAGGTTCCAGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGACAGATTTCACTCTCAGTA  
 TCAACAGTGTGGAGACTGAAGATTTTGAATGTATTTCTGTCAACAGAGTAACAGCTGTGGACGTTCCGGTGGAGGC  
 ACCAAGCTGGAAATCAAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCGCATGCACC



Fig. 2 A

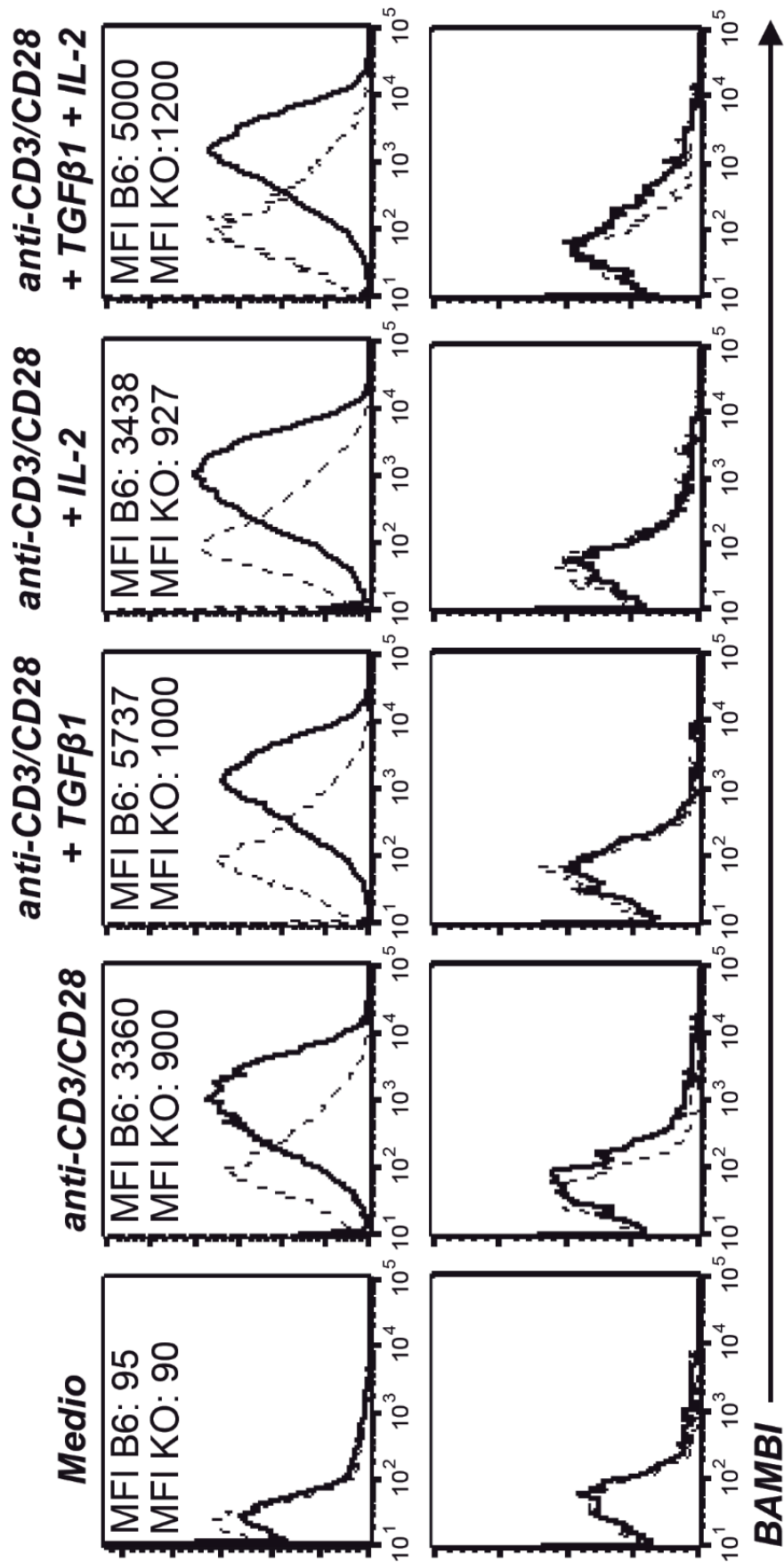


Fig. 2 B

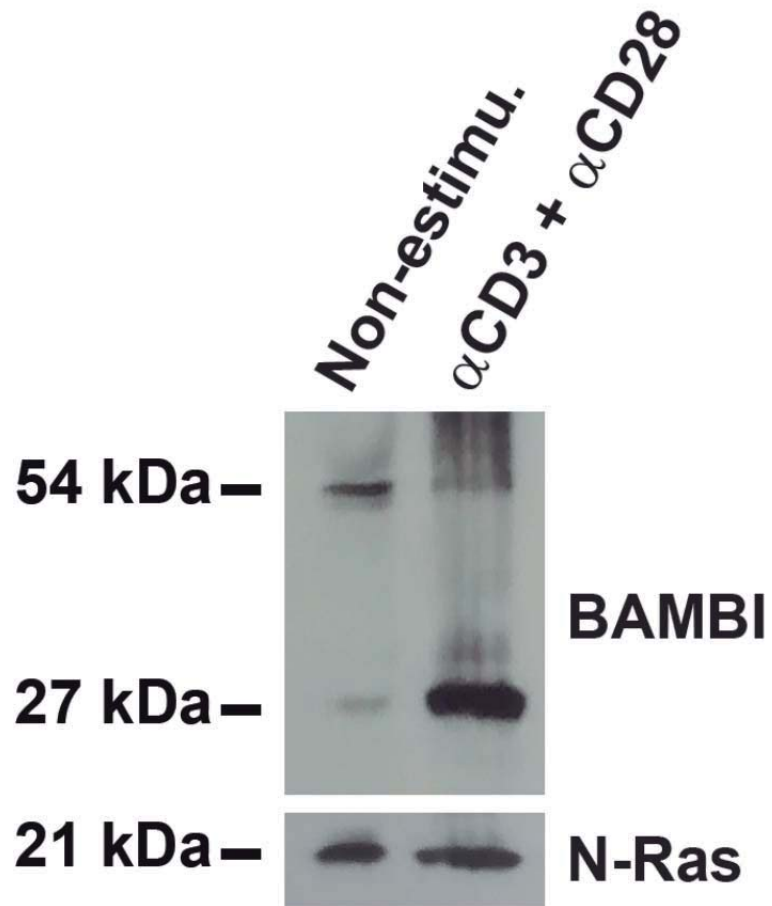


Fig. 3 A

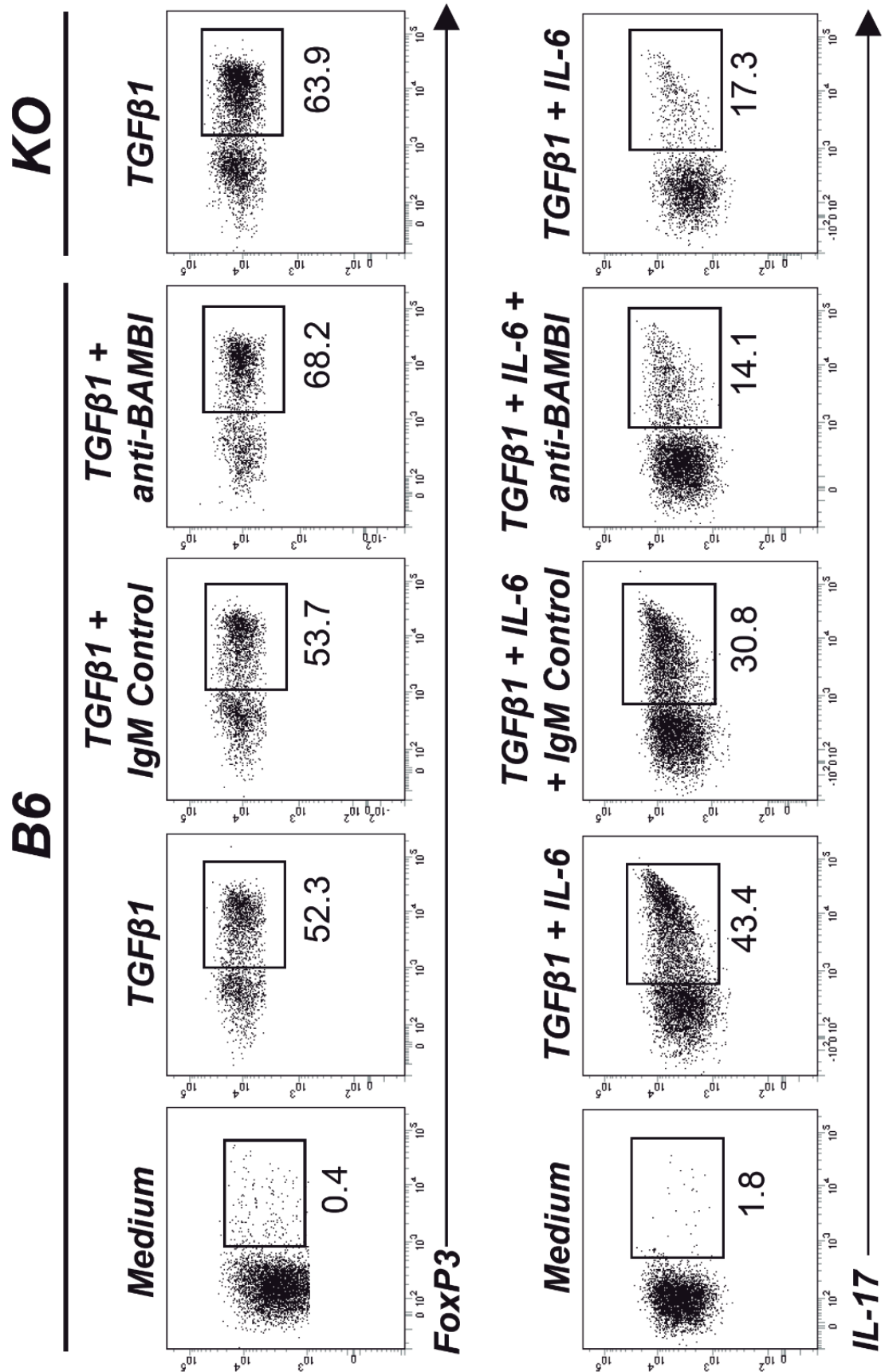


Fig. 3 B

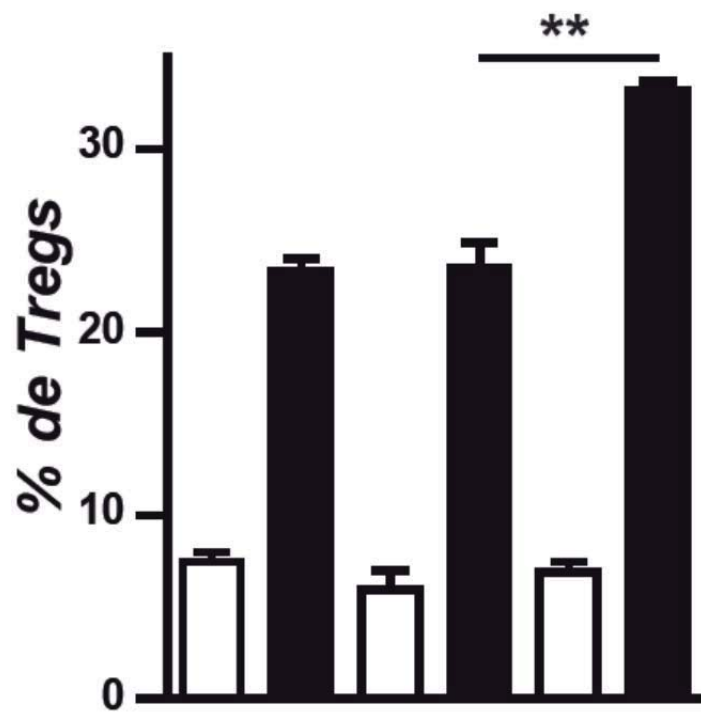


Fig. 3 C

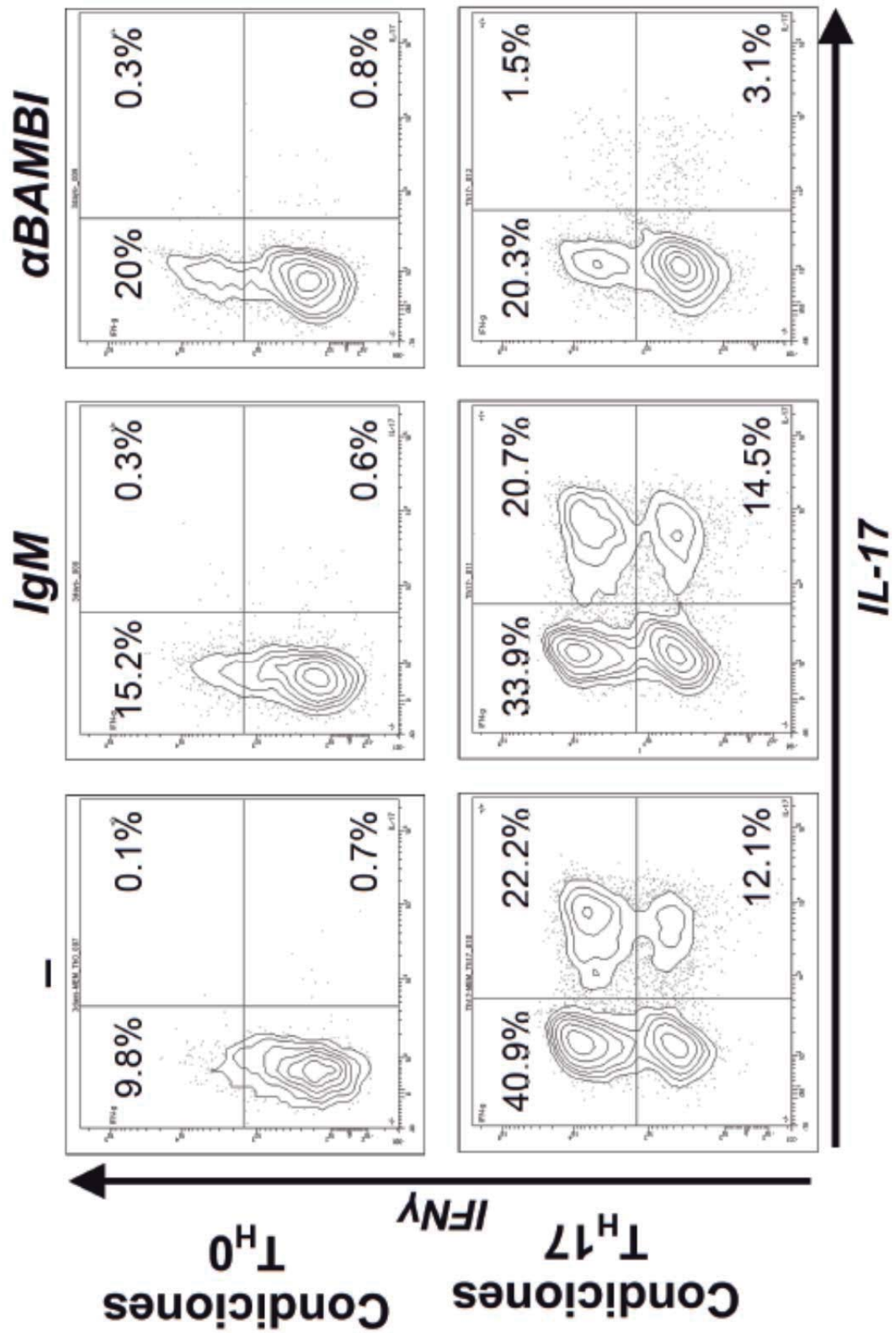


Fig. 4 A

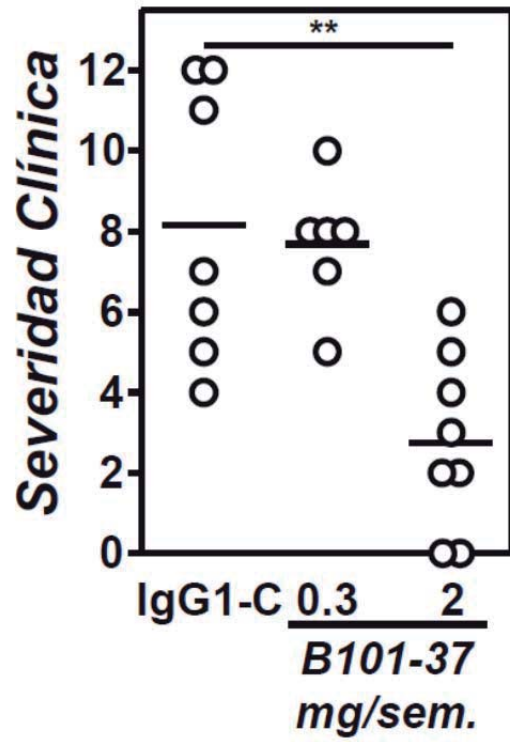


Fig. 4 B

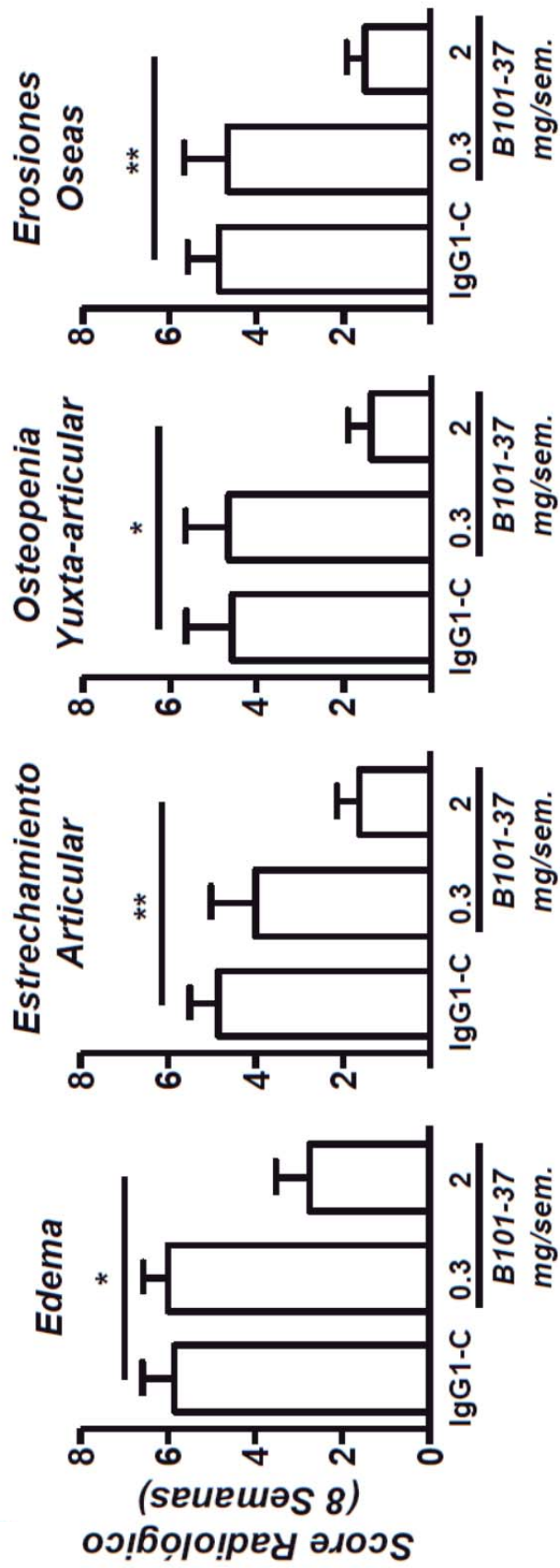


Fig. 4 C

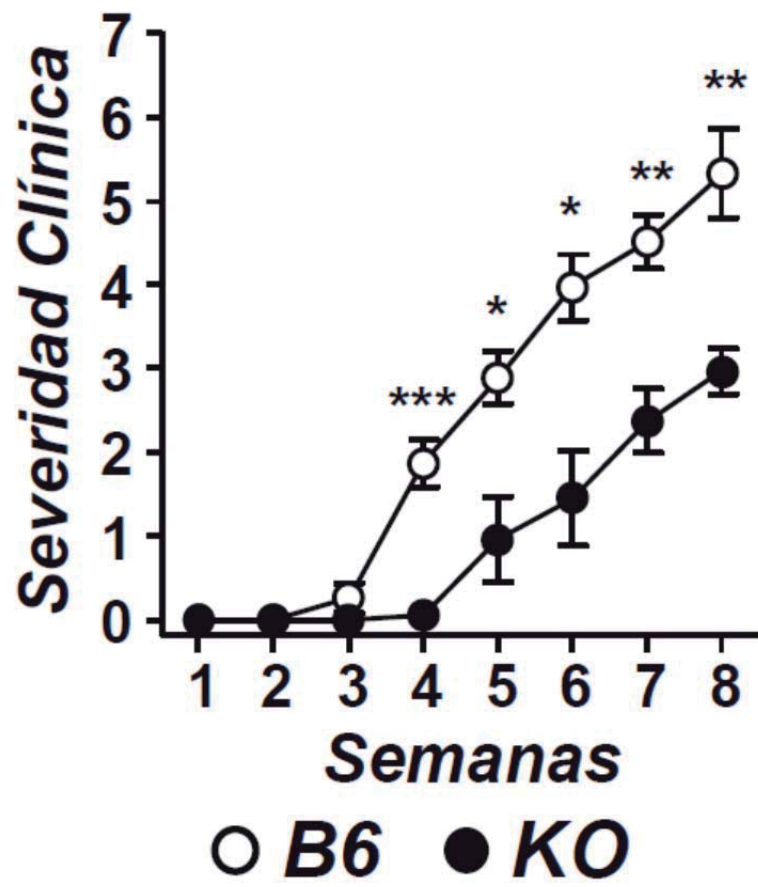




Fig. 4 D

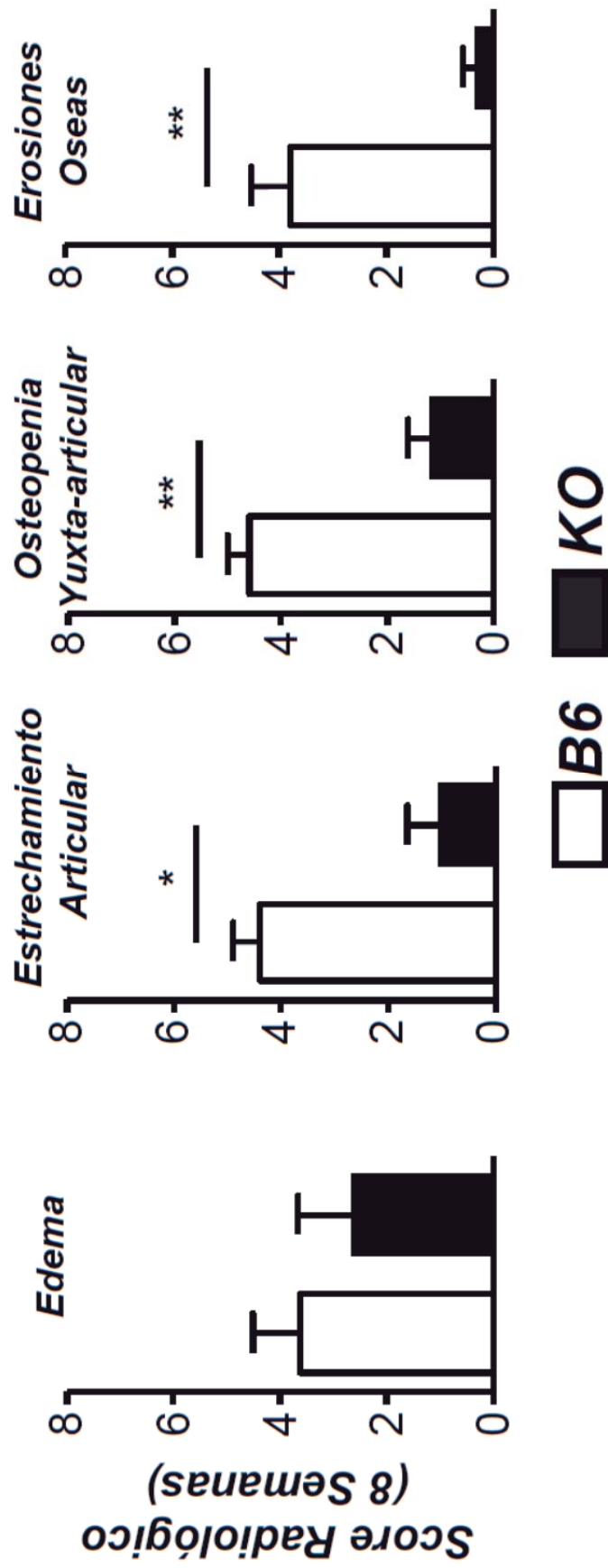


Fig. 5 A

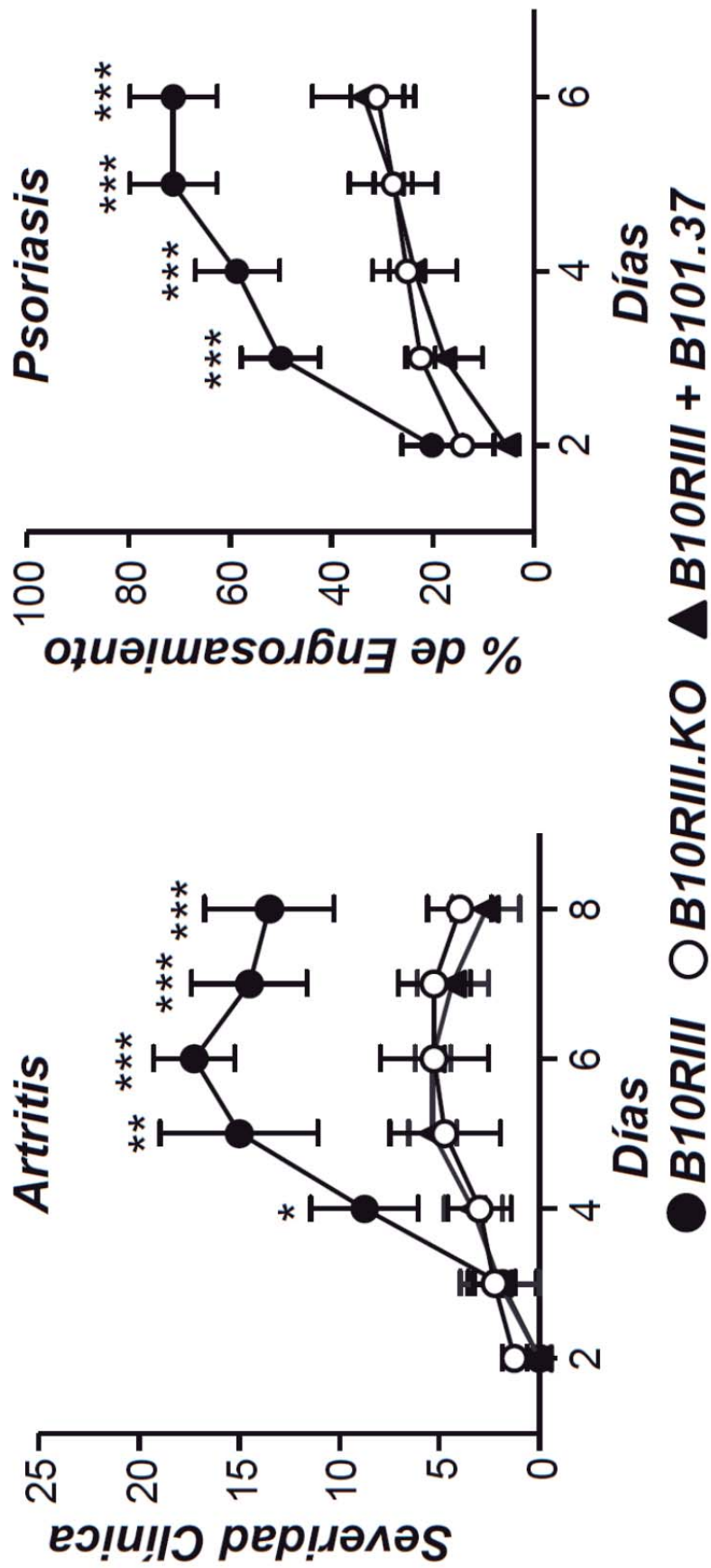


Fig. 5 B

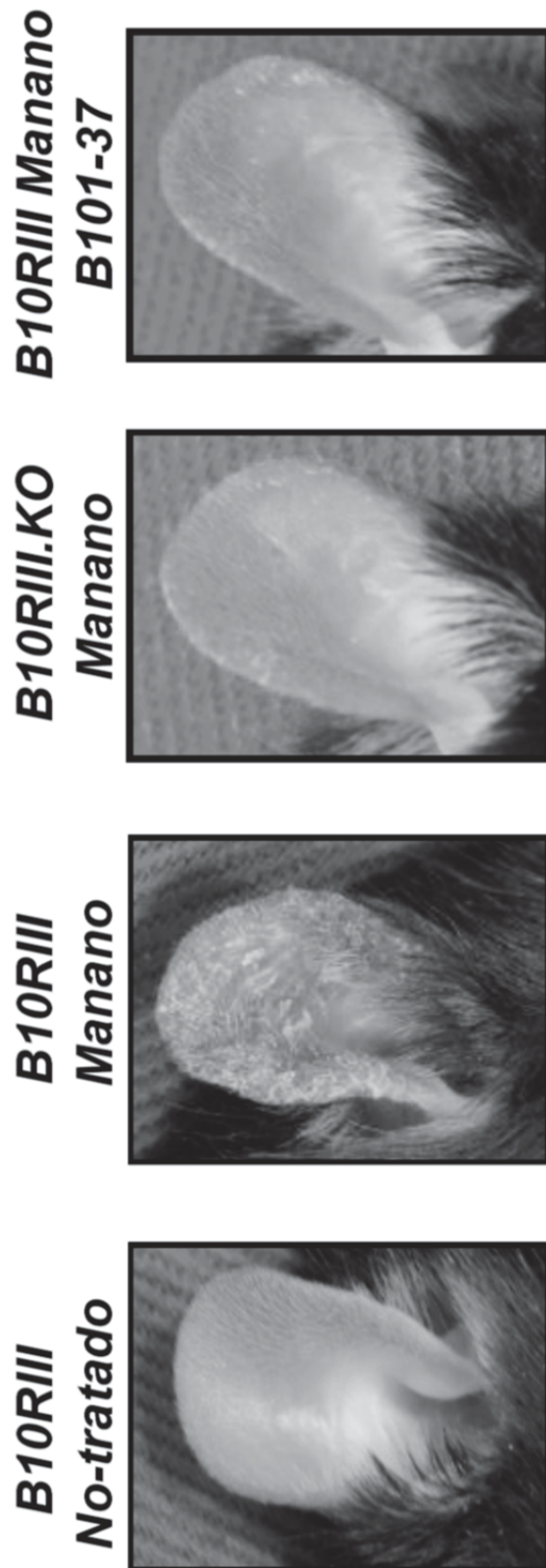


Fig. 6 A

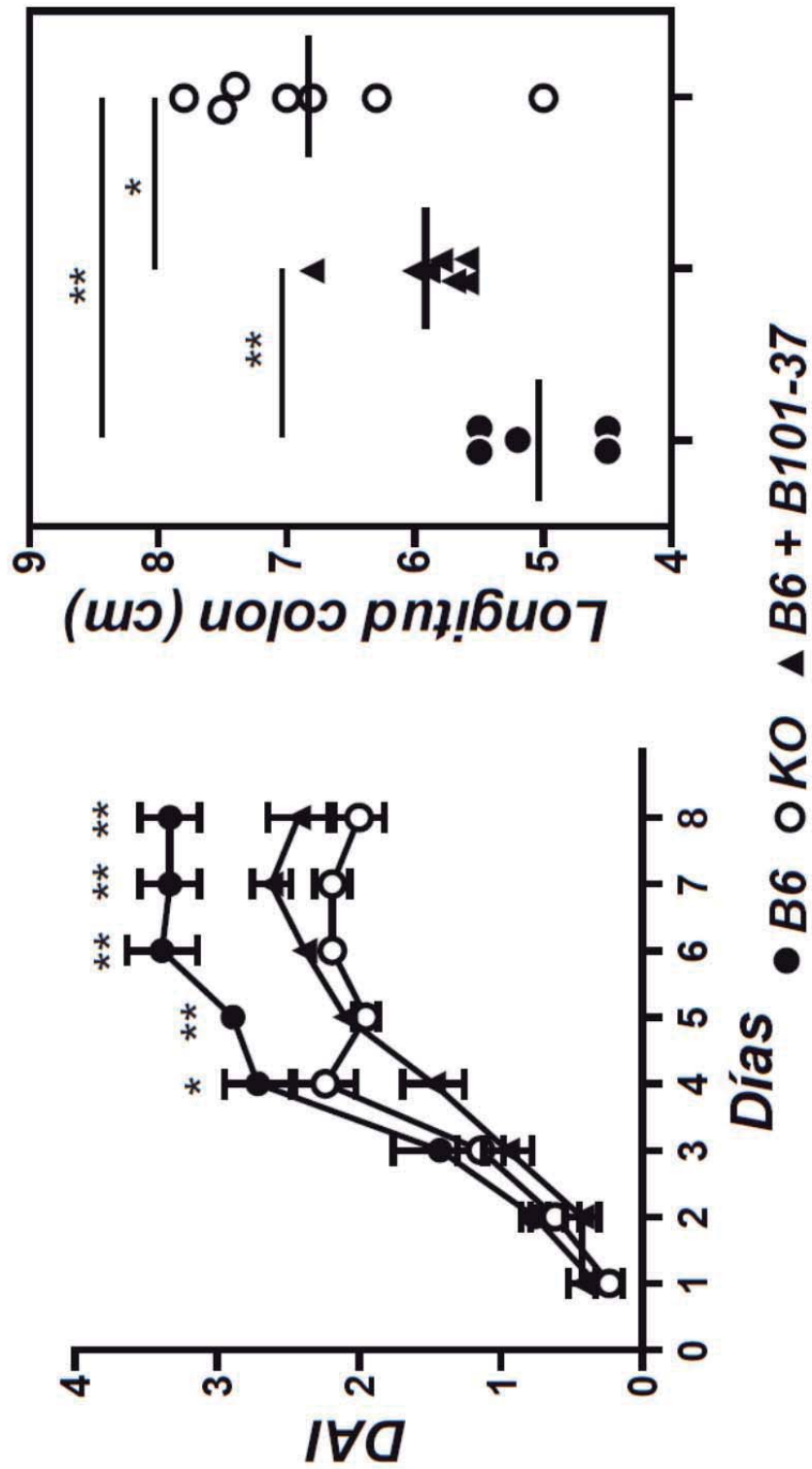
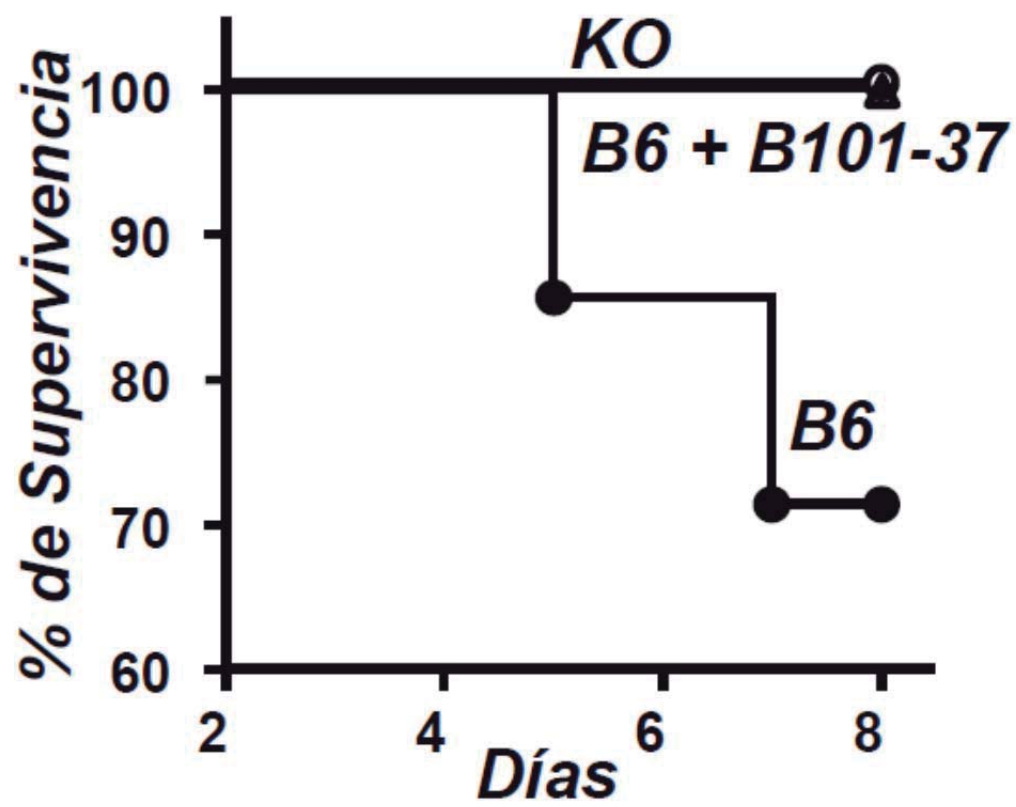


Fig. 6 B



LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)  
Universidad de Cantabria

<120> Anticuerpos monoclonales frente a BAMBI y uso para tratamiento de  
enfermedades inflamatorias

<130> ES1641.1157

<160> 11

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
<211> 25  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> péptido BAMBI 109-133 murino

<400> 1

Leu His Asp Val Leu Ser Pro Ser Lys Ser Glu Ala Ser Gly Gln Gly  
1 5 10 15

Asn Arg Tyr Gln His Asp Ser Ser Arg  
20 25

<210> 2  
<211> 25  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> péptido BAMBI 109-133 humano

<400> 2

Leu His Asp Val Leu Ser Pro Pro Arg Gly Glu Ala Ser Gly Gln Gly  
1 5 10 15

Asn Arg Tyr Gln His Asp Gly Ser Arg  
20 25

<210> 3  
<211> 396  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> ACM B101-3 cadena pesada

<400> 3

cagctggagc agtcaggacc tgagctgaag aggcctggag agacagtcaa gttctcctgc	60
aagggttctg ggtatccctt cacaactat ggaatgcact gggtgaaaca ggctccagga	120
aagggtttta agtggatggg ctggataaac acccactg gagagccaac atatgctgat	180
gacttcaggg gacggtttgc cttctctttg gaaacctctg ccagcactgc ctatttgcag	240
atcaacaacc tcaaaaatga ggacacggct acatatttct gtgcaagaga gggttattat	300

# ES 2 626 491 A1

aactacgaag gctggtactt cgatgtctgg ggcgcagggg ccacgggtcac cgtctcctca 360  
gccaaaacga caccgccatc tgtctataga tcttcc 396

<210> 4  
<211> 365  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> ACM B101-3

<400> 4  
gggagctcga cattgtgctg acccagtctc catccagtct gtctgcatcc cttggagaca 60  
caattaccat cacttgccat gccagtcaga acatttattt ttggttaagt tgggtaccagc 120  
agaaaccagg aaatattcct aaactattga tctataaggc ttccaacttg cacacaggcg 180  
tcccatcaag gtttagtggc agtggatctg gaacagggtt cacattaacc atcagcagcc 240  
tgacgcctga agacattgcc acttactact gtcaacaggg tcaaagttat ccgctcacgt 300  
tcggtgctgg gaccaagctg gagctgaaac gggctgatgc tgcaccaact gtatccgcac 360  
gcacc 365

<210> 5  
<211> 384  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> ACM B143-14 cadena pesada

<400> 5  
cttccggaat tccaagttca gctggaggag tcaggggctg agcttgtgaa gcctggggct 60  
tcagtgaaga tgtcctgcaa ggcttctggc tacaccttca ccagctactg gataaactgg 120  
gtgaagctga ggcctggaca aggccttgag tggattggag atatttatcc tggtagtggt 180  
agtactaact acaatgagaa gttcaagagc aaggccacac tgactgtaga cacatcctcc 240  
agcacagcct acatgcaact cagcagcctg acatctgagg actctgcggt ctattactgt 300  
gcaactgggt ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtctctc agagagtcag 360  
tccttcccaa atgtcagatc ttcc 384

<210> 6  
<211> 362  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> ACM B143-14 cadena ligera

<400> 6  
gggagctcga cattgtgctc acccagtctc cagccaccct gtctgtgact ccaggagata 60  
gcgtcagtct ttctgcagg gccagccaaa gtattagcaa caacctacac tggatatcaac 120  
aaaaatcaca tgagtctcca aggcttctca tcaagtatgc ttcccagtc atctctggga 180

# ES 2 626 491 A1

tcccctccag gttcagtggc agtggatcag ggacagattt cactctcagt atcaacagtg 240  
 tggagactga agatttttggga atgtatttct gtcaacagag taacagctgg tggacgttcg 300  
 gtggaggcac caagctggaa atcaaacggg ctgatgctgc accaactgta tccgcatgca 360  
 cc 362

<210> 7  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> amplímero 5' degenerado de la región FR1 de la cadena pesada

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (18)..(18)  
 <223> n is a, c, g, or t

<400> 7  
 cttccggaat tcsargtnma gctgsagsag tc 32

<210> 8  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> amplímero 3' de la región constante de IgG1

<400> 8  
 ggaagatcta tagacagatg ggggtgtcgt tttggc 36

<210> 9  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> amplímero 3' de la región constante de IgM

<400> 9  
 ggaagatctg acatttggga aggactgact ctc 33

<210> 10  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> amplímero degenerado de la región FR1 de la cadena ligera kappa

<400> 10  
 gggagctcga tattgtgmts acmcarwctm ca 32

<210> 11  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial



<220>

<223> amplicero 3' de la región constante de la cadena ligera kappa

<400> 11

ggtgcatgcg gatacagttg gtgcagcatc

30